

УДК: 575.222.7:633.16

ИНДУКЦИЯ И ПРОЯВЛЕНИЕ РАДИОАДАПТИВНОГО ОТВЕТА КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ЛИНИЙ И ГИБРИДА ПОДСОЛНЕЧНИКА Е.Ю.Баєва

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Исследования направлены на защиту биологических объектов от повреждающего действия ионизирующей радиации. Изучали радиоадаптивный ответ (РАО) – индуцированное излучением в малых дозах повышение устойчивости клеток и организмов к высоким дозам радиации – в связи с явлением гетерозиса. РАО проявлялся у материнской формы и гибрида, но степень его выраженности была различна. Защитная реакция (РАО) активировалась после стимуляционного воздействия предоблучения, и в большей мере проявлялась при предоблучении двумя адаптирующими режимами. Максимальная выраженность РАО по показателю митотической активности у гибрида обусловлена, по-видимому, его гетерозисным состоянием.

Ключевые слова: *Helianthus annuus L., радиоадаптивный ответ, гетерозис, митотическая активность, абберрации хромосом.*

Введение

Исследования, направленные на защиту биологических объектов от повреждающего действия ионизирующей радиации, повышение их устойчивости, приобрели большую актуальность в связи с возрастающим антропогенным загрязнением окружающей среды. В последние десятилетия выявлена возможность индуцированного повышения устойчивости живых организмов к высоким дозам радиации, т.н. радиоадаптивный ответ (РАО) (Филиппович, 1991).

РАО представляет собой индуцированное излучением в малых дозах повышение устойчивости клеток и организмов к высоким дозам радиации.

Механизмы формирования РАО изучены недостаточно. Предполагают, что как индуцированная защитно-восстановительная реакция, РАО определяется комплексом молекулярно-клеточных событий (Sasaki et al., 2002; Shmidt-Ullrich et al., 2000) и связан с активацией систем репарации ДНК (Tateishi et al., 2000), а также с усилением деления клеток (Шестопалова, Долгова, 2001). Пролиферативная активность меристемы как одна из составляющих РАО обеспечивает восстановление по типу репопуляции (Серебряный и др., 2005).

В природе организмы испытывают влияние многих факторов. В связи с этим представляет интерес изучение т.н. перекрестного адаптивного ответа, с использованием совместного воздействия двух адаптирующих режимов – гамма-радиации и радиоволн миллиметрового диапазона. Каждый фактор в отдельности при облучении им в малой дозе способен оказывать стимулирующее воздействие на рост и развитие живых организмов (Бержанская и др., 1993). Радиопротекторное, активирующее деление клеток (Шестопалова и др., 1991; Долгова, 2004) и синтез АТФ (Девятков и др., 1991) действие радиоволн мм-диапазона послужило аргументом для их использования в качестве дополнительного адаптирующего фактора.

Феномен РАО выявлен в экспериментах с бактериями, клетками животных и человека *in vitro*. Об индукции и проявлении РАО у растений в связи с гетерозисом сведений нет. При изучении реакции гибридов и родительских форм на предпосевное облучение семян малыми дозами гамма-радиации (Турбин и др., 1977) показано, что с увеличением гомозиготности материала радиоустойчивость растений снижается.

Целью работы было изучение РАО по показателям митотической активности клеток меристемы линий и гибрида.

Методика

Материалом для исследования были клетки корневой меристемы проростков семян подсолнечника *Helianthus annuus L.* инбредных линий Сх 503А и Х 711В и гетерозисного гибрида Харьковский 58, полученного от их скрещивания, селекции Института растениеводства имени В.Я.Юрьева УААН.

Сухие семена облучали γ -радиацией, источником которой был ^{60}Co , на установке «Исследователь» (мощность облучения – 3,21 Гр/мин) в ХНУ им. В.Н.Каразина, а также радиоволнами миллиметрового диапазона (ППЭ – 100 мкВт/см², f – 61,5 ГГц, время воздействия – 20 мин.), на генераторе Г4-142 в Институте радиофизики и электроники НАНУ. В качестве адаптирующих

и повреждающих доз брали установленные ранее (Шестопалова и др., 1991) и известные из литературы (Преображенская, 1971) дозы облучения семян. Варианты эксперимента: 1) адаптирующее облучение γ -радиацией в дозе 50 Гр; 2) повреждающее облучение в дозе 200 Гр; 3) воздействие адаптирующего режима γ -радиации перед действием ударной дозы для формирования РАО (50 – 200); 4) воздействие двух адаптирующих режимов (γ -радиации и радиоволн мм-диапазона) перед действием ударной дозы для формирования РАО (Р – 50 – 200). В качестве контроля использовали необлученные семена.

Семена проращивали в рулонах фильтровальной бумаги при температуре 21-23°C. Для исследования отбирали семена с одинаковой скоростью прорастания и фиксировали в уксусном спирте (3:1) в течение первых митотических циклов через каждые 2 часа (с 33-го по 51-й), отбирая для каждого варианта по 5-10 корешков на одну фиксацию. Готовили постоянные давленные препараты, окрашенные реактивом Шиффа (Паушева, 1980). В каждом корешке просматривали 1000 клеток для определения митотической активности (МА) и 150-200 анафаз для определения частоты клеток с абберациями хромосом.

Стимулирующее и угнетающее действие адаптирующей и повреждающей доз определяли при сравнении с контролем. Проявление РАО оценивали при сравнении варианта 200 Гр и вариантов с предварительным воздействием адаптирующих режимов.

Статистическую обработку полученных данных проводили по стандартной методике (Рокицкий, 1973). Достоверность разницы оценивали по критерию Фишера. Разницу считали достоверной при $P \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения уровней и динамики митотической активности корневой меристемы проростков представлены на рис. 1. В контроле первые деления клеток появлялись на 33 ч. от начала замачивания семян. В этот период четко проявлялось превосходство гибрида над родительскими формами: резкий подъем МА с 3,0% до 8,3% у гибрида связан с синхронизацией делений и увеличением пролиферативного пула – следствием гетерозисной гибридизации.

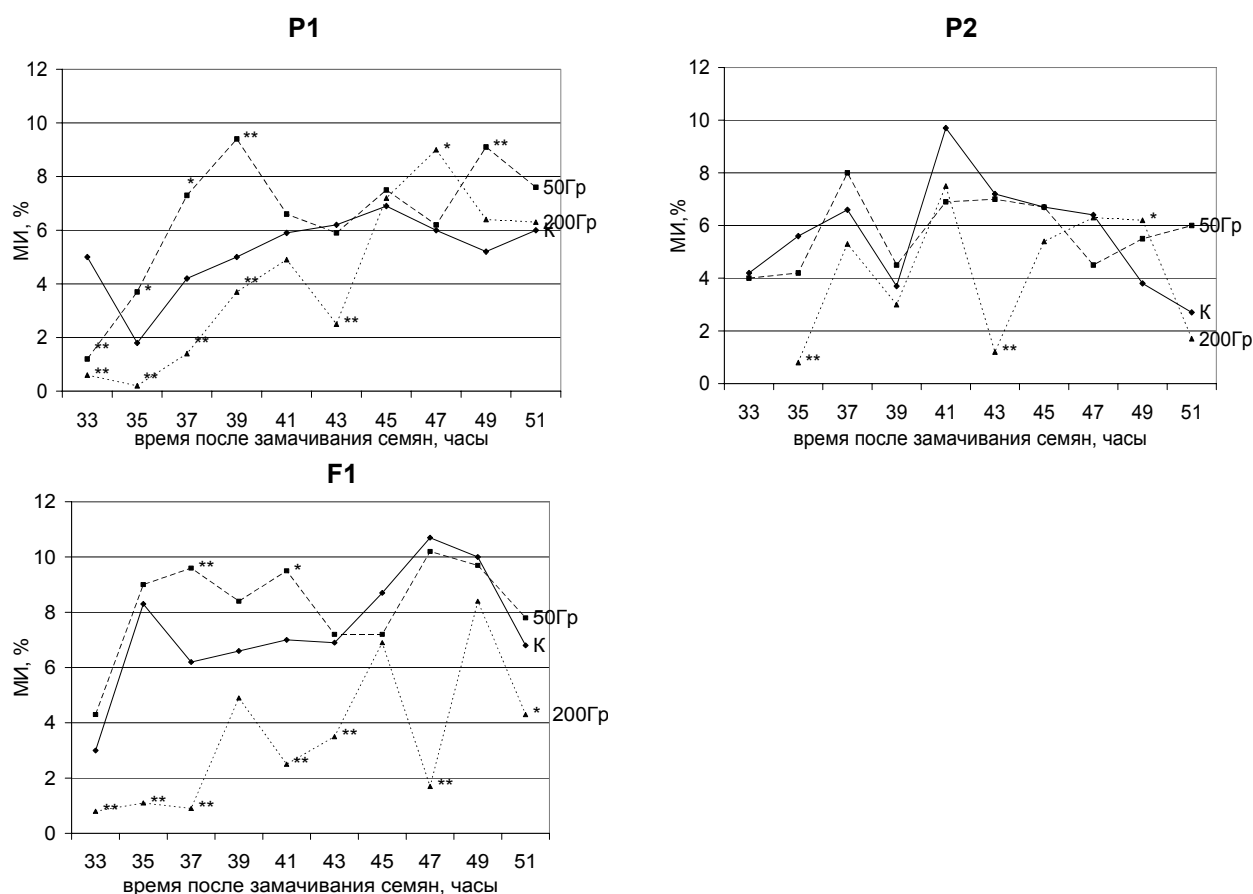


Рис. 1. Воздействие адаптирующей и ударной доз гамма-радиации на митотическую активность клеток корневой меристемы родительских линий и гибрида подсолнечника

* – $P \geq 0,99$, ** – $P \geq 0,999$

В ранние сроки наблюдения (33-41 ч.) максимального значения митотическая активность клеток меристемы гибрида достигала на 35 ч. от замачивания, а у родительских форм – только на 41 ч. Известно, что у гибридных организмов в единицу времени готовится к митозу и вступает в него большее, чем у исходных форм, число клеток (Шестопалова, 1981). Это связано с увеличением доли клеток, находящихся в S-фазе, и с синхронным прохождением клетками меристемы зародышей гетерозисных гибридов постсинтетической фазы, что обусловило не только более высокую, но и более раннюю, чем у родительских форм, первую волну митозов.

Такое преимущество гетерозисных организмов можно объяснить активными процессами, происходящими еще при созревании семян на материнском растении, в том числе и связанными с подготовкой клеток к делению.

Влияние адаптирующей дозы гамма-радиации на митотическую активность клеток корневой меристемы. Эффект синхронизации первых делений сохранялся после воздействия адаптирующей дозы гамма-радиации. У гибрида происходило резкое увеличение митотического индекса (МИ) с 4,3% на 33 ч. до 9,0% на 35 ч., у материнской формы малая доза индуцировала слабо выраженную синхронизацию, обусловив подъем митотической активности с 1,2% до 3,7%.

Наибольшая стимуляция митотической активности клеток под воздействием адаптирующей дозы была отмечена у материнской формы (превышение над контрольным вариантом составило в среднем за весь срок наблюдения 30%), в меньшей степени – у гибрида (20%). Следует отметить, что для гибрида был характерен не стимулированный, а естественный высокий уровень митотической активности (максимальный МИ – 9,0% (первый пик) и 10,2% (второй пик) в варианте 50 Гр против 8,3% (первый пик) и 10,7% (второй пик) в контроле), тогда как для материнской формы этот уровень существенно ниже (максимальный МИ в контроле – 6,9%). У отцовской формы стимуляция была выражена незначительно – превышение над контролем отмечали только на 37-39 и 49-51 ч.

Влияние ударной, критической для вида дозы. Одной из первых реакций сухих семян на облучение является торможение метаболизма у тронувшихся в рост клеток после замачивания семян. Под воздействием ударной дозы (рис. 1) у всех исследуемых форм происходило угнетение пролиферативной активности, хотя и в разной степени. В первые часы наблюдения (33-35 ч.) интенсивность размножения клеток существенно снижалась, у отцовской формы отмечали задержку делений на 2 часа. Задержка делений является одним из защитных механизмов клеток на действие генотоксических агентов, во время которой происходит активизация репарационных процессов и устранение повреждений ДНК. Время задержки зависит от степени повреждения генома (Гродзинский, 2000) и интенсивности восстановления радиационных повреждений хромосом.

Максимальное подавление размножения клеток во все сроки наблюдали у гибрида, особенно на 33-37 часах. В этот период МИ в варианте с действием ударной дозы составил 1,1%, тогда как в контроле показатель достигал 8,3%. Возможно, такое значительное угнетение связано с меньшей продолжительностью митотического цикла (Шестопалова, 1981) и меньшей гетерогенностью популяции меристематических клеток у семян гибридных растений (Гродзинский, 2000), а также с тем, что в семенах гетерозисных растений многие клетки зародыша могут находиться не в G₀-периоде, как у исходных форм, а в G₁ – G₂-периодах, более радиочувствительных к повреждающим воздействиям (Епифанова, 2003). Кроме того, в течение первого митотического цикла у гетерозисных гибридов восстанавливается в два раза больше клеток, чем у исходных родительских форм (Турбин и др., 1977), и снижение митотической активности могло быть связано с репарационными процессами. В этом случае у гибрида частота клеток с абберациями хромосом должна быть ниже, чем у линий. Подтверждением этой гипотезы могут служить данные анализа количества клеток с абберациями хромосом (АХ), представленные в табл. 1.

Таблица 1.

Частота клеток с абберациями хромосом в корневой меристеме линий и гибрида подсолнечника после облучения семян гамма-радиацией

Форма	200 Гр			50 – 200			Р – 50 – 200		
	Всего ана-телофаз	Из них с АХ		Всего ана-телофаз	Из них с АХ		Всего ана-телофаз	Из них с АХ	
		шт.	%		шт.	%		шт.	%
P1	1013	190	18,7±1,2	270	32	11,8±1,9**	859	149	17,3±1,3
P2	717	102	14,2±1,3	407	35	8,6±1,3**	593	43	7,2±1,0**
F1	710	82	11,5±1,2	1301	186	14,3±1,0*	1341	187	13,9±0,9

* - $P \geq 0,95$, ** - $P \geq 0,999$

Индукция и проявление РАО

Основная задача работы состояла в изучении возможности формирования РАО.

В ранние сроки после облучения для материнской формы (рис. 2А) отмечали лишь слабую тенденцию к формированию РАО после совместного воздействия двух адаптирующих режимов – гамма-радиации и радиоволн. При предоблучении одной гамма-радиацией не только не индуцировался РАО, но и происходило снижение митотической активности в 3 раза по сравнению с вариантом 200 Гр. Известно, что в клетках инбредных линий многие гены находятся в репрессированном состоянии, формирование же РАО связано с их активацией. По-видимому, на данном этапе роста предварительные воздействия двух, а тем более одного адаптирующего фактора не привели к необходимой степени дерепрессии генов.

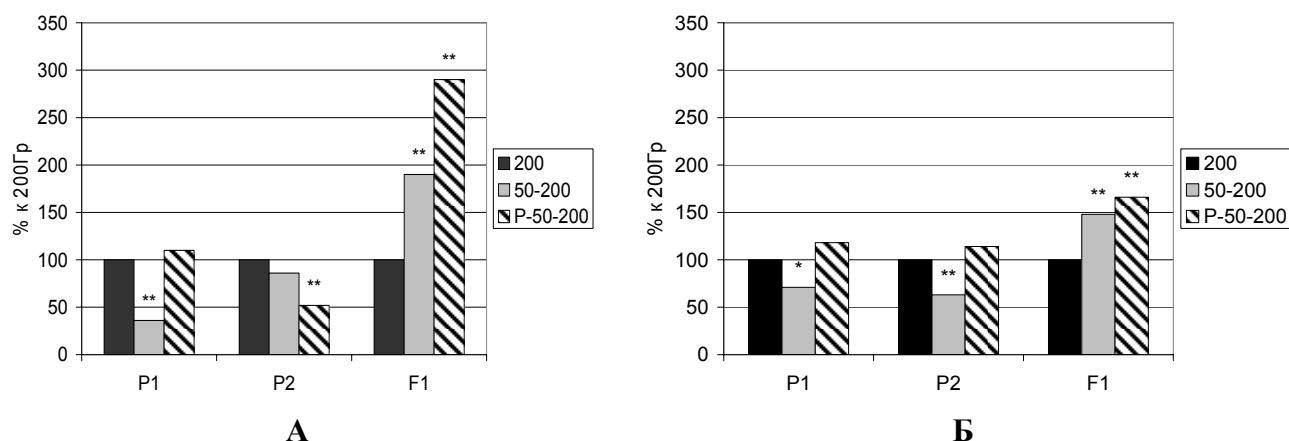


Рис. 2. Индукция и проявление радиоадаптивного ответа клетками корневой меристемы проростков родительских линий и гибрида подсолнечника

А – 33–41 ч. от начала замачивания; Б – 43–51 ч. от начала замачивания

* - $P \geq 0,05$; ** - $P \geq 0,001$

У отцовской формы в ранние сроки после облучения РАО не индуцировался ни в одном из вариантов. Можно сделать вывод о связи стимулирующего воздействия адаптирующей дозы, которого у P2 отмечено не было, с формированием адаптивного ответа.

В ходе роста проростков наблюдали тенденцию к повышению степени выраженности РАО (рис. 2Б): для отцовской формы средний показатель митотической активности в варианте P-50-200 по отношению к митотической активности в варианте 200 Гр за первые 10 часов наблюдения составлял 52%, а за последующие 10 часов достигал 114%, тем самым отражая позднюю индукцию РАО. Аналогичную картину наблюдали и у материнской формы в варианте 50-200: несмотря на отсутствие РАО, степень выраженности радиобиологической реакции увеличивалась с 36% до 68%.

У гибрида РАО четко проявлялся в обоих вариантах в течение всего срока наблюдения. Предоблучение одним фактором обусловило превышение над вариантом 200 Гр на 90%, а двумя факторами – на 190%.

По уровню хромосомного мутагенеза (табл. 1) РАО наблюдали у линий. Частота клеток с АХ в вариантах с предоблучением была значительно ниже, чем при воздействии только ударной дозы. У гибрида РАО проявлялся по максимальным значениям частоты аберрантных клеток. Предварительное воздействие гамма-радиации обусловило снижение количества повреждений с 28,6% до 24,7%, а совместное действие двух адаптирующих режимов – до 19,2%.

Радиоустойчивость как полигенно контролируемый количественный признак формируется при участии всех метаболических процессов, темпы и интенсивность которых обуславливают общую устойчивость организма к неблагоприятным факторам среды. У гетерозисных организмов эти процессы протекают с большей интенсивностью – величины биоэнергетических показателей (уровень макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов) превышают таковые родительских форм (Титок и др., 2005). Активация систем репарации ДНК происходит путем индукции синтеза ферментов de novo (Данильченко, Гродзинский, 2004), а так как в клетках гибрида могут находиться два и более аллеля одного и того же гена, это способствует сохранению оптимальной активности фермента в более широком диапазоне условий (при воздействии ударной дозы), чем у родительских форм.

Кроме того, важным условием деятельности организма является лабильность различных клеточных компонентов, в том числе белков и ферментов (Гапоненко и др., 1998). Стимулирующее действие малой дозы состоит в повышении доли лабилизированных форм компонентов, которые

наиболее подходят для нормального метаболизма в условиях действия радиации, а при последующем облучении большой дозой смогут обеспечить быструю и мощную защиту путем активации процессов репарации повреждений и деления клеток.

Способность к своевременной реакции на облучение зависит и от согласованности регуляции функционирования метаболических процессов, которая у гибридов по сравнению с родительскими формами осуществляется более координировано на различных уровнях – от клеточного до организменного (Титок и др., 2005).

Таким образом, феномен РАО проявляется у материнской формы и гибрида, но степень выраженности его различна. Защитная реакция (РАО) активируется после стимуляционного воздействия предоблучения, и в большей мере проявляется при предоблучении двумя адаптирующими режимами. Максимальная выраженность РАО по показателю митотической активности у гибрида обусловлена, по-видимому, его гетерозисным состоянием.

Список литературы

- Бержанская Л.Ю., Белоплотова О.Ю., Бержанский В.Н. Действие электромагнитного излучения на высшие растения // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 1993. – №2. – С. 68–71.
- Гапоненко В.И., Суховер Л.К., Шамаль Н.В. Повышение чувствительности проростков ржи и ячменя к экстремальным условиям после γ -облучения семян в стимулирующих дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1998. – Т.38, вып.5. – С. 713–719.
- Гродзинский Д.М. Радиобіологія. – К.: Либідь, 2000. – 448с.
- Данильченко О.О., Гродзинський Д.М. Участь систем репарації ДНК у формуванні РАВ у рослин // Тези доповідей наукової конференції «Парадигми сучасної радіобіології». – Київ-Чорнобиль, 2004. – С. 15–16.
- Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – М.: Радио и связь, 1991. – 168с.
- Долгова Т.А. Індукція і прояв радіоадаптивної відповіді у поколіннях рослин з різним генотипом. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – К., 2004. – 22с.
- Епифанова О.И. Лекции о клеточном цикле. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2003. – 160с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304с.
- Преображенская Е.И. Радиоустойчивость семян растений. – М.: Атомиздат, 1971. – 232с.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Мн.: Вышэйш. школа, 1973. – 320с.
- Серебряный А.М., Зоз Н.Н., Морозова И.С. К механизму антимуtagenеза у растений // Генетика. – 2005. – Т.41, №5. – С. 676–679.
- Титок В.В., Юренкова С.И., Титок М.В., Хотылева Л.В. Характеристика энергетического метаболизма в онтогенезе льна-долгунца при гетерозисе // Генетика. – 2005. – Т.41, №5. – С. 668–675.
- Турбин Н.В., Володин В.Г., Гордей И.А. Гетерозис и радиоустойчивость растений. – Мн.: Наука и техника, 1977. – 152с.
- Филиппович И.В. Феномен адаптивного ответа клеток в радиобиологии // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1991. – Т.31, Вып.6. – С. 803–813.
- Шестопалова Н.Г. Репродукция клеток при гетерозисе. – Харьков: Вища школа. Изд-во при Харьк. ун-те, 1981. – 84с.
- Шестопалова Н.Г., Головина Л.Н., Корнеевков В.А. и др. Способ предпосевной обработки семян для синхронизации клеточных делений зародышевой меристемы зерновых культур: А.с. № 1692408 СССР. Заявлено 27.12.89. Опубл. 23.11.91. Бюл. №43. – С.16.
- Шестопалова Н.Г., Долгова Т.А. Радиационная адаптация на ранних этапах онтогенеза растений // Биол. Вестник. – 2001. – Т.5, № 1-2. – С. 112–115.
- Sasaki M.S., Ejima Y., Tachibana A. et al. DNA damage response pathway in radioadaptive response // Mutat. Research. – 2002. – 504. – P. 101–118.
- Shmidt-Ullrich R.K., Dent P., Grant S. et al. Signal transduction and cellular radiation responses // Radiat. Research. – 2000. – 153. – P. 245–257.
- Tateishi S., Sakuraba Y., Masuyama S. et al. Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens // PNAS. – 2000. – Vol.97, №14. – P. 7927–7932.

ІНДУКЦІЯ І ПРОЯВ РАДІОАДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ КЛІТИН КОРЕНЕВОЇ МЕРИСТЕМИ ЛІНІЙ І ГІБРИДУ СОНЯШНИКА
О.Ю.Басва

Дослідження спрямовані на захист біологічних об'єктів від пошкоджуючої дії іонізуючої радіації. Вивчали радіоадаптивну відповідь (РАВ) – індуковане випромінюванням у малих дозах підвищення стійкості клітин і організмів до високих доз радіації – у зв'язку з явищем гетерозису. РАВ індукувався у материнської форми і гібрида, але ступінь його прояву був різний. Захисна реакція (РАВ) активувалася після стимуляційного впливу попереднього опромінення, і більшою мірою проявлялася після опромінення двома адаптуючими режимами. Максимальна РАВ за показником мітотичної активності у гібрида може бути обумовлена його гетерозисним станом.

Ключові слова: *Helianthus annuus L.*, радіоадаптивна відповідь, гетерозис, мітотична активність, аберації хромосом.

RADIOADAPTIVE RESPONSE INDUCTION AND DISPLAY IN SUNFLOWER ROOT MERISTEM CELLS OF PARENTAL STRAINS AND HYBRID
O.Yu.Bayeva

Researches are guided on protection of living beings against ionizing radiation damaging action. Radioadaptive response (RAR) – a biological defense mechanism in which low-dose ionizing radiation elicits cellular resistance to the genotoxic effects of subsequent irradiation – was studied in view of heterosis phenomenon. The RAR was detected in maternal form and hybrid, but with different degree of manifestation. Defense reaction (RAR) was activated after conditioning effect of preliminary irradiation, and in a greater extent after preirradiation by two adaptive regimes. Maximal RAR intensity in hybrid can be explained by its heterotic status.

Key words: *Helianthus annuus L.*, radioadaptive response, heterosis, mitotic activity, chromosomal aberration.

Матеріали наукової конференції біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, присвяченої 100-річчю з дня народження Г.І.Семененка
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою